

校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 21620071151962

UDC_____

廈門大學

硕士学位论文

河蚬及鳄鱼胆汁提取物对肝癌细胞
SMMC-7721 的抑制效应

The Inhibitory Effects of Extracts of *Corbicula fluminea* and
Crocodylus siamensis bile on Hepatocarcinoma SMMC-7721

邱乒乓

指导教师姓名: 陈清西 教授

专业名称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2010 年 04 月 日

论文答辩时间: 2010 年 05 月 日

学位授予日期: 2010 年 月 日

答辩委员会主席: 黄耀坚

评阅人: _____

2010 年 06 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为(酶学)课题(组)的研究成果,获得(酶学)课题(组)经费或实验室的资助,在(陈清西)实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ☒ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 2013 年 5 月 31 日解密，解密后适用上述授权。

（ ☐ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

本文主要缩略语表

| 英文缩写 | 英文全称 | 中文全称 |
|------|--|-----------|
| CFE | Ethyl acetate extract of <i>Corbicula fluminea</i> | 河蚬乙酸乙酯萃取物 |
| MTT | Methyl Thiazolyltetrazolium | 噻唑蓝 |
| PBS | Phosphate Buffered Saline | 磷酸盐缓冲液 |
| DMSO | Dimethyl Sulfoxide | 二甲亚砜 |
| AO | Acridine orange | 吖啶橙 |
| EB | Ethidium bromide | 溴乙锭 |
| SDH | Succinodehydrogenase | 琥珀脱氢酶 |
| PI | Propidine iodide | 碘化丙啶 |
| FCM | Flow cytometry | 流式细胞术 |
| PS | Phosphatidyserine | 磷脂酰丝氨酸 |
| FITC | Fluorescein isothiacyanate | 异硫氰酸荧光素 |
| ROS | Reactive oxygen species | 活性氧 |
| CA | Cholic acid | 胆酸 |
| DCA | Deoxycholic acid | 去氧胆酸 |
| CDCA | Chenodeoxy cholic acid | 鹅去氧胆酸 |
| LCA | Lithocholic acid | 石胆酸 |
| UCDA | Ursodeoxycholic acid | 熊去氧胆酸 |
| CDK | Cyclin-dependent kinas | 细胞周期素依赖酶 |

目 录

| | |
|--------------------------------|----|
| 中文摘要..... | 1 |
| 英文摘要..... | 2 |
| 1.前言..... | 4 |
| 1.1 肝癌基础研究概况..... | 4 |
| 1.1.1 诱发肝癌的因素..... | 4 |
| 1.1.1.1 肝炎病毒..... | 4 |
| 1.1.1.2 黄曲霉毒素..... | 5 |
| 1.1.1.3 饮水污染..... | 5 |
| 1.1.1.4 过度饮酒..... | 5 |
| 1.1.1.5 遗传因素..... | 5 |
| 1.1.2 目前采用的治疗手段..... | 6 |
| 1.2 动物来源的天然产物在肿瘤治疗中的应用..... | 7 |
| 1.2.1 动物来源的天然产物的活性成分与药理作用..... | 7 |
| 1.2.2 中医药中动物药的性能特点..... | 9 |
| 1.2.2 河蚬的研究背景..... | 10 |
| 1.2.3 鳄鱼的研究背景..... | 11 |
| 1.3 细胞凋亡的途径及检测方法..... | 12 |
| 1.4 本论文研究的内容及意义..... | 16 |
| 2. 实验试剂与仪器 | 18 |
| 2.1 主要材料和试剂..... | 18 |
| 2.2 主要实验仪器..... | 19 |
| 3. 实验方法..... | 21 |
| 3.1 河蚬天然活性物质的制备..... | 21 |
| 3.1.1 天然活性提取物的薄层层析实验..... | 21 |
| 3.1.2 天然活性提取物的高效液相色谱及质谱实验..... | 21 |
| 3.2 鳄鱼胆汁提取物的制备..... | 23 |
| 3.3 肿瘤细胞株..... | 23 |

| | |
|--|----|
| 3.4 肿瘤细胞的培养..... | 23 |
| 3.4.1 细胞培养液的配制..... | 23 |
| 3.4.2 细胞复苏..... | 23 |
| 3.4.3 细胞培养与传代..... | 24 |
| 3.4.4 细胞冻存..... | 24 |
| 3.5 噻唑蓝还原法 (MTT 法) 测定效应物对细胞的抑制作用 | 24 |
| 3.6 原位培养细胞形态改变的观察..... | 25 |
| 3.6.1 光学倒置显微镜下细胞形态的观察..... | 25 |
| 3.6.2 姬姆萨染色观察..... | 25 |
| 3.6.3 Hoechst 33258 染色观察 | 25 |
| 3.6.4 AO/EB 染色观察..... | 26 |
| 3.7 DNA 抽提与琼脂糖凝胶电泳..... | 26 |
| 3.8 PI 单染流式细胞术分析细胞周期..... | 26 |
| 3.9 Annexin V- FITC /PI 双染流式细胞术检测细胞凋亡..... | 27 |
| 3.10 细胞内活性氧 ROS 的测定..... | 27 |
| 3.11 RNA 的提取与 RT-PCR..... | 27 |
| 3.11.1 总 RNA 的提取 | 27 |
| 3.11.1 逆转录合成 cDNA | 28 |
| 3.11.2 荧光 PCR..... | 29 |
| 4. 结果..... | 30 |
| 4.1 河蚬天然活性物质的分离纯化..... | 30 |
| 4.1.1 有机溶剂萃取产物..... | 30 |
| 4.1.2 甾类化合物的鉴定..... | 31 |
| 4.1.3 薄层层析 (TLC) 用于混合化合物的分离 | 31 |
| 4.1.4 高效液相色谱分离纯化混合化合物..... | 32 |
| 4.1.5 MALDI – TOF 质谱仪测定化合物的分子量 | 35 |
| 4.2 河蚬天然活性物质对肝癌细胞 SMMC-7721 的增殖抑制作用 | 37 |
| 4.3 河蚬天然活性物质对肝癌细胞 SMMC-7721 细胞周期的影响 | 39 |
| 4.4 鳄鱼胆汁提取物对肝癌细胞 SMMC-7721 的增殖抑制作用 | 40 |

| | |
|---|----|
| 4.5 鳄鱼胆汁生理盐水提取物对肝癌细胞 SMMC-7721 形态的影响 | 42 |
| 4.5.1 普通光镜下鳄鱼胆汁提取物作用前后 SMMC-7721 形态学变化 .. | 42 |
| 4.5.2 姬姆萨染色观察结果..... | 44 |
| 4.5.3 Hoechst33258 染色观察结果 | 45 |
| 4.5.4 AO/EB 染色观察结果..... | 46 |
| 4.6 鳄鱼胆汁提取物阻滞肝癌细胞 SMMC-7721 的细胞周期 | 47 |
| 4.7 Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞术定量检测细胞凋亡..... | 50 |
| 4.8 鳄鱼胆汁提取物对细胞内活性氧 ROS 的影响..... | 51 |
| 4.9 鳄鱼胆汁提取物诱导肝癌细胞 SMMC-7721 DNA 片段化..... | 53 |
| 4.10 鳄鱼胆汁提取物对肝癌细胞周期相关基因表达的调控..... | 54 |
| 4.10.1 鳄鱼胆汁提取物对人肝癌 SMMC-7721 细胞 Mt p53 基因 mRNA 转录的影响..... | 54 |
| 4.10.2 鳄鱼胆汁提取物对人肝癌细胞 c-myc 基因 mRNA 转录的影响 .. | 56 |
| 4.10.3 鳄鱼胆汁提取物对人肝癌 SMMC-7721 细胞 CyclinD1 基因 mRNA 转录的影响..... | 56 |
| 4.10.4 鳄鱼胆汁提取物对人肝癌 SMMC-7721 细胞 P21 ^{WAF1/CIP1} 基因 mRNA 转录的影响 | 57 |
| 5. 讨 论..... | 58 |
| 5.1 河蚬活性物质的分离纯化及其对肝癌细胞的影响..... | 58 |
| 5.2 鳄鱼胆汁提取物体外诱导肝癌细胞 SMMC-7721 凋亡 | 59 |
| 5.3 鳄鱼胆汁提取物体外诱导肝癌细胞 SMMC-7721 凋亡的机制 | 62 |
| 6. 结 论..... | 66 |
| 7. 参考文献..... | 67 |
| 在学期间发表论文 | 74 |
| 致 谢..... | 75 |

Contents

| | |
|---|----|
| Abstract in Chinese | 1 |
| Abstract in English..... | 2 |
| 1 Introduction..... | 4 |
| 1.1 General introduction of hepatocarcinoma..... | 4 |
| 1.1.1 Etiological research..... | 4 |
| 1.1.1.1 Viral hepatitis | 4 |
| 1.1.1.2 Aflatoxin | 5 |
| 1.1.1.3 Pollution of drinking water | 5 |
| 1.1.1.4 Excessive drinking..... | 5 |
| 1.1.1.4 Genetic factor..... | 5 |
| 1.1.3 Therapy | 6 |
| 1.2 The antitumor activity of natural products from animal | 7 |
| 1.2.1 The active components and pharmacological effect of natural products from animal | 7 |
| 1.2.2 The performance characteristics of animal drugs in traditional Chinese medicine..... | 9 |
| 1.2.2 Research background of <i>Corbicula fluminea</i> | 10 |
| 1.2.3 Research background of <i>Crocodylus siamensis</i> | 11 |
| 1.3 The pathway and detection method of apoptosis..... | 12 |
| 1.4 Contents and significance of this study | 16 |
| 2. Reagents and instruments | 18 |
| 2.1 Major reagents and materials | 18 |
| 2.2 Major instruments | 19 |
| 3. Methods..... | 21 |
| 3.1 Preparation of natural active substances from <i>Corbicula fluminea</i> | 21 |
| 3.1.1 The TLC experiment of natural active substances..... | 21 |

| | |
|--|----|
| 3.1.2 The HPLC and MS experiment of natural active substances..... | 21 |
| 3.2 Preparation of extracts of <i>Crocodylus siamensis</i> bile | 23 |
| 3.3 Tumor cell lines..... | 23 |
| 3.4 Tumor cells culture | 23 |
| 3.4.1 Preparation of cell culture medium..... | 23 |
| 3.4.2 Cell recovery | 23 |
| 3.4.3 Cell passage | 24 |
| 3.4.4 Cell cryopreservation | 24 |
| 3.5 Antitumor activity of effector determined by MTT assay | 24 |
| 3.6 Observation of morphology of cell cultured in situ | 25 |
| 3.6.1 Observation of cell morphology by optical inverted microscope..... | 25 |
| 3.6.2 Observation of Giemsa staining..... | 25 |
| 3.6.3 Observation of Hoechst 33258 staining..... | 25 |
| 3.6.4 Observation of AO/EB staining | 26 |
| 3.7 DNA Ladder assay | 26 |
| 3.8 Cell cycle determined by PI single staining flow cytometry | 26 |
| 3.9 Annexin V- FITC /PI double staining flow cytometry..... | 27 |
| 3.10 ROS activity assay | 27 |
| 3.11 RNA extraction and RT-PCR | 27 |
| 3.11.1 Extraction of total..... | 27 |
| 3.11.1 cDNA synthesized by reverse transcription | 28 |
| 3.11.2 Quantitative fluorescent PCR..... | 28 |
| 4. Results..... | 30 |
| 4.1 Isolation and purification of natural active substances from <i>Corbicula fluminea</i> | 30 |
| 4.1.1 Organic solvent extraction products | 30 |
| 4.1.2 Identification of steroids | 31 |
| 4.1.3 Separation of mixtures by TLC..... | 31 |
| 4.1.4 Isolation and purification of mixtures by HPLC..... | 32 |

| | |
|---|----|
| 4.1.5 Determination of molecular weight of compound by MALDI – TOF | 35 |
| 4.2 Natural active components of <i>Corbicula fluminea</i> inhibit the growth of SMMC-7721 cells | 37 |
| 4.3 Natural active components of <i>Corbicula fluminea</i> change the cell cycle of SMMC-7721 cells | 39 |
| 4.4 The extracts of <i>Crocodylus siamensis</i> bile inhibit the proliferation of SMMC-7721 cells | 40 |
| 4.5 Effect of saline solute components of <i>Crocodylus siamensis</i> bile on the morphology of SMMC-7721 cells | 42 |
| 4.5.1 Saline solute components of <i>Crocodylus siamensis</i> bile change the morphology of SMMC-7721 cells under optical microscope | 42 |
| 4.5.2 The result of Giemsa staining | 44 |
| 4.5.3 The result of Hoechst33258 staining | 45 |
| 4.5.4 The result of AO/EB staining | 46 |
| 4.6 Effect of saline solute components of <i>Crocodylus siamensis</i> bile on cell cycle | 47 |
| 4.7 Quantitative detection of SMMC-7721 cells apoptosis by Annexin V-FITC/PI double staining | 50 |
| 4.8 The change of ROS by the saline solute components of <i>Crocodylus siamensis</i> bile in SMMC-7721 cells | 51 |
| 4.9 DNA fragmentation of SMMC-7721 cells induced by the saline solute components of <i>Crocodylus siamensis</i> bile | 53 |
| 4.10 The saline solute components of <i>Crocodylus siamensis</i> bile regulate the expression of cell cycle-related gene in SMMC-7721 cells | 54 |
| 4.10.1 Effects of saline solute components of <i>Crocodylus siamensis</i> bile on the expression of Mt p53 mRNA in SMMC-7721 cells | 54 |
| 4.10.2 Effects of saline solute components of <i>Crocodylus siamensis</i> bile on the expression of c-myc mRNA in SMMC-7721 cells | 56 |
| 4.10.3 Effects of saline solute components of <i>Crocodylus siamensis</i> bile on | |

| | |
|--|----|
| the expression of CyclinD1 mRNA in SMMC-7721 cells..... | 56 |
| 4.10.4 Effects of saline solute components of <i>Crocodylus siamensis</i> bile on the expression of P21 ^{WAF1/CIP1} mRNA in SMMC-7721 cells..... | 57 |
| 5. Discusson | 58 |
| 5.1 Effect of the extracts from <i>Corbicula fluminea</i> on SMMC-7721 cells..... | 58 |
| 5.2 Apoptosis of SMMC-7721 cells <i>in vitro</i> induced by saline solute components of <i>Crocodylus siamensis</i> bile | 59 |
| 5.3 Study on the anticancer mechanism of saline solute components of <i>Crocodylus siamensis</i> bile in SMMC-7721 cells <i>in vitro</i> | 62 |
| 6. Conclusions..... | 66 |
| 7. References..... | 67 |
| Publications..... | 74 |
| Acknowledgements..... | 75 |

中文摘要

肝癌是我国最常见的恶性肿瘤之一，对于肝癌的治疗，目前仍以手术切除为首选方法，但术后复发率高，且绝大多数患者在确诊时已属临床中晚期，从而不具备手术治疗的条件。因此，寻找其他非手术方法治疗肝癌就显得十分必要。药物治疗作为一种可单独使用也可参与综合治疗的方法在肝癌的治疗中占有重要地位。研究和发现新的、高效、低毒副作用的肝癌治疗药物是当务之急。

本论文以体外培养的人肝癌细胞 SMMC-7721 为药物筛选模型，采取甲醇抽提、有机溶剂萃取等方法得到河蚬乙酸乙酯萃取物 (CFE)，经高效液相色谱进一步分离，最终得到 Cf1、Cf2、Cf3 三个主峰。用 MTT 法和流式细胞术研究河蚬提取物的抗癌作用，结果表明，河蚬乙酸乙酯萃取物对肝癌细胞具有浓度和时间依赖性的增殖抑制作用，处理细胞 48 h、72 h 后， IC_{50} 分别为 135 $\mu\text{g/mL}$ 和 70 $\mu\text{g/mL}$ ，处理后的肝癌细胞经流式细胞术检测，细胞出现明显的凋亡峰，细胞周期出现 G_0/G_1 期阻滞。通过对从河蚬乙酸乙酯萃取物中分离出的 Cf1、Cf2、Cf3 的抗癌效应的测定可知乙酸乙酯萃取物中主要的活性成分为 Cf1。

本研究分析比较了鳄鱼胆汁不同提取物的抗肝癌作用，选用肝癌细胞最为敏感的鳄鱼胆汁生理盐水提取物进行进一步的研究。应用普通光学显微镜及荧光显微镜观察鳄鱼胆汁生理盐水提取物对 SMMC-7721 细胞形态学的影响；流式细胞术检测细胞周期变化和细胞凋亡；Annexin V-FITC/PI 双染法考察经效应物干预后细胞的凋亡情况；DNA Ladder 法分析细胞核染色质 DNA 的变化；流式细胞术检测胞内 ROS 的积累情况；RT-PCR 测定癌基因及抑癌基因 Mt p53、c-myc、CyclinD1、p21^{WAF1/CIP1} 的表达。结果表明，鳄鱼胆汁生理盐水提取物能使肝癌细胞的形态学特征发生显著的变化，对细胞周期影响呈浓度和时间效应，细胞出现明显的 G_0/G_1 期阻滞现象，Annexin V-FITC/PI 双染和 DNA 片段分析显示鳄鱼胆汁能够诱导 SMMC-7721 细胞凋亡。ROS 检测和 RT-PCR 的结果提示，鳄鱼胆汁诱导肝癌细胞凋亡的过程伴随着胞内 ROS 的升高，以及 Mt p53 和 c-myc 基因表达的降低。结合以上结果分析鳄鱼胆汁诱导肝癌细胞凋亡可能的分子机制是通过升高胞内 ROS 的水平，下调 Mt p53 和 c-myc 基因的表达，从而引发细胞的 G_0/G_1 期阻滞，抑制细胞增殖，进而诱导细胞凋亡。

关键词：肝癌；河蚬；鳄鱼胆汁；细胞凋亡

Abstract

Hepatocarcinoma is one of the most ubiquitous malignance cancers. For the treatment of hepatocarcinoma, surgical resection is currently still the preferred method. But the recurrence rate of surgical resection is high and the tumor often present at an advanced unresectable stage at the time of diagnosis for the majority patients, which eliminates the surgical approach as a curative measure. Thus, it is important to find out an effective therapeutic method excluded surgical. Medication plays an important role in the therapy of hepatocarcinoma, it can be used alone or used with other methods in combination therapy. Therefore, it is urgent to research and find out new effective and low toxicity therapeutic drugs for hepatocarcinoma.

In this study, cultured human hepatocarcinoma cell line SMMC-7721 *in vitro* was used as the model for drug screening. We obtain ethyl acetate extract of *Corbicula fluminea* (CFE) through methanol and organic solvent extraction. After HPLC, three main peaks were purified, we named them Cf1、Cf2、Cf3 respectively. The antitumor activity of *Corbicula fluminea* extracts was measured by MTT method and flow cytometry. The result showed that CFE displayed growth inhibitory effect in a dose and time manner against hepatocarcinoma SMMC-7721 cells. SMMC-7721 cells were treated with CFE for 48h and 72h, the IC_{50} were 135 $\mu\text{g/mL}$ and 70 $\mu\text{g/mL}$, respectively. Flow cytometry analysis showed that CFE could induce the emergence of the peak of apoptosis, and arrest the cell cycle at G_0/G_1 phase. We further investigated the inhibitory activity of Cf1、Cf2 and Cf3, and discovered that Cf1 was the most effective component in CFE.

During this research, we compared the antitumor activity of different extraction of *Crocodylus siamensis* bile, and we find out that hepatocarcinoma cell was more sensitive to the saline solute components of *Crocodylus siamensis* bile than other extract. So we used saline solute components of *Crocodylus siamensis* bile for the further studies. The morphological change of SMMC-7721 cells was detected by inverted microscope and fluorescence microscope. The effects of *Crocodylus siamensis* bile on the cell cycles and cell apoptosis of SMMC-7721 were observed by flow cytometry (FCM). Annexin V-FITC/PI was used to study the cell apoptosis. DNA Ladder analysed the nuclear chromatin DNA changes in hepatocarcinoma cell. The accumulation of ROS in the SMMC-7721 cells was measured by FCM. RT-PCR was used to detect the expressions of Mt p53、c-myc、CyclinD1 and p21

WAF1/CIP1. The result showed that the saline solute components of *Crocodylus siamensis* bile could significantly change the morphology of SMMC-7721 cells. Flow cytometric profiles revealed that the extract of *Crocodylus siamensis* bile led to the increase of the cell percentage of G₀/G₁ phase and the cell percentage of apoptosis. DNA Ladder method and Annexin V-FITC/PI method proved that the extract of *Crocodylus siamensis* bile could induce the apoptosis of the human hepatocarcinoma SMMC-7721 cells *in vitro*. During this process, ROS accumulation was mediated and the expression of Mt p53 and c-myc were down-regulated, which were determined by FCM and RT-PCR. The possible molecular mechanisms of apoptosis effect induced by *Crocodylus siamensis* bile on hepatocarcinoma cells were considered to down-regulating the expression of Mt p53 and c-myc, which led to the increase of the cell percentage of G₀/G₁ phase and the inhibition of cells growth, and then induced the apoptosis of the human hepatocarcinoma SMMC-7721 cells.

Key Words: Hepatocarcinoma; *Corbicula fluminea*; *Crocodylus siamensis* bile; Apoptosis.

1.前言

1.1 肝癌基础研究概况

肝癌（Hepatocarcinoma）是严重危害人类生命健康的疾病之一，据统计，全球肝癌发病率位居恶性肿瘤发病率的第 5 位，死亡率位居第 3 位^[1]。中国肝癌死亡率属于世界高死亡水平，我国肝癌的死亡率在消化系统恶性肿瘤中列第三位，仅次于胃癌和食管癌^[2]。

从我国地理分布上看，肝癌高发区大多属温暖、潮湿的海洋性气候。沿海发病率高于内地，沿海岛屿和内河入海口地区高于沿海其他地区，农村高于城市。其中江苏启东、广西扶绥、广东中山、福建同安等地的肝癌死亡率位居全国前列，启东多年来的发病率一直在 50/10 万以上，且还在不断上升^[3]。从年龄组死亡曲线分布看，高发年龄为 35~45 岁，肝癌死亡率通常随年龄的增长而上升。从性别上看，肝癌常见于男性。在欧美等低发区，性别比很小；越是高发区男性发病的比例越高。

1.1.1 诱发肝癌的因素

1.1.1.1 肝炎病毒

乙型肝炎病毒（HBV）和丙型肝炎病毒（HCV）感染被认为是肝癌的主要病因，HBV 感染的情况在肝癌高发区非常普遍，其感染率高达 80%~90%，HBV 携带者比 HBV 阴性者的肝癌发病率高 100 倍^[4]。HBV 能通过将自身基因组整合到宿主细胞而破坏 HBV 的 DNA 序列和宿主细胞的基因序列，或者发生重新整合，从而使癌基因激活和抑癌基因失活，最终导致细胞癌变^[5]。而慢性乙型肝炎则可引起肝组织的坏死和炎症，大大增加肝细胞癌变的概率，并促进肝细胞的增殖^[6]。在我国 HBV 感染相关性肝癌占主导地位，而在日本、德国、法国和意大利等发达国家则以 HCV 感染为主。国外资料的 Meta 分析结果显示，HCV 感染对肝癌的 OR 值达 11.5，而且与 HBV 混合感染表现出协同作用^[7]。HCV 是一种典型的 RNA 病毒，目前尚未发现其基因组或片段可整合人类肝细胞，其致癌机制普遍认为是由于 HCV 编码的核心蛋白在体外有潜在的直接致癌作用，HCV 还可经一些特异或非特异性的免疫机制引起慢性肝细胞损伤、导致肝硬化，进而间接导致原发性肝癌^[8]。

1.1.1.2 黄曲霉毒素

存在于霉变油粮作物大米、大豆、玉米、花生中的黄曲霉毒素 B1 (AFB1) 是一种强致癌剂, 可诱发动植物发生肝癌。国外研究表明黄曲霉毒素与抑癌基因 p53 的突变密切相关, 在黄曲霉毒素高暴露区的肝癌病人体内均能检测到 p53 基因突变, 并主要发生在 249 和 254 位密码子上, 突变的 p53 蛋白可以抑制野生型 p53 介导的细胞凋亡以及 DNA 修复功能^[9]。在中国和非洲等肝癌流行地区中既有黄曲霉毒素饮食暴露又伴随有慢性 HBV 感染。

1.1.1.3 饮水污染

饮水污染是肝癌的又一病因。70 年代苏德隆教授提出饮用沟塘水居民比一般居民肝癌发病率高 2.6 倍, 饮用井水居民比一般居民低 1/3, 改用深井水肝癌发病率下降^[10]。苏德隆用高效液相色谱法和液相色谱-质谱法证实了在沟塘水大量繁殖的蓝绿藻含有微囊藻毒素 (MC), 并证明了 MC 是一种强烈的促肝癌物质^[11]。有研究证实, 微囊藻毒素中存在最普遍、含量最多、毒性较大的三种异构体式 MC-LR、MC-RR 和 MC-YR^[12], 它们主要影响了调控细胞凋亡的癌基因和抑癌基因的表达^[13]。

1.1.1.4 过度饮酒

在许多欧洲国家、美国及澳大利亚, 饮酒可能是慢性肝病病因中最重要的因素。尽管没有实验证据表明酒精本身是致癌物, 但一些流行病学的研究仍指出, 饮酒与原发性肝癌的危险性增加有关。在瑞典的一项病例对照研究中, 发现重度饮酒者 (每周饮酒量超过 370 mL), 患肝癌的危险性增加 4 倍。定期饮酒者 (每月饮酒量超过 370 mL, 而每周少于 370 mL), 肝癌危险性增加 3 倍^[14]。酒精致癌, 迄今尚无实验室证据, 一些报道称其有间接促癌作用。已经提出几种机制来解释酒精在原发性肝癌发生中的作用: ①酒精及其代谢产物, 特别是乙醛的直接致突变作用; ②亲电子成分代谢产物对 DNA 的损失作用; ③引起雌激素和 (或) 雄激素类固醇代谢障碍而起促癌作用; ④维生素 A 缺乏, 研究表明慢性酒精中毒患者原发性肝癌组织及癌周肝组织中缺乏这种具有抗癌作用的物质。

1.1.1.5 遗传因素

国内多项恶性肿瘤发病和死亡登记资料及临床流行病学调查研究结果显示, 包括肝癌在内, 多种恶性肿瘤都表现有癌家族聚集现象, 表现为在一个家

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库